

Válaszok Dr Szűcs Mária professzornő opponensi véleményére, melyet a „Characterization of new antinociceptive ligands in rat model: preclinical studies,, című Ph.D. munkámmal kapcsolatban megfogalmazott.

Tisztelt Professzornő !

Mindenekelőtt szeretném megköszönni, hogy elvállalta Ph.D. munkám opponensi felkérését.

Szeretném megköszönni munkám alapos, mélyreható elemzését és számomra kedvező megítélését. Gondolatébresztő megjegyzései, kérdései alkalmat adtak munkán ismételt, alapos átgondolására. Az opponensi véleményben megfogalmazott kritikai észrevételek, megjegyzések és kérdések lehetőséget biztosítanak a dolgozat talán kevésbé kidolgozott részeinek pontosabb értelmezéséhez.

Professzornő megjegyzéseire az alábbiakban szeretnék válaszolni:

1. Az Aims fejezet túl rövidre sikerült, melyben nem szerepel sem a ligandok szerkezete, sem az ok, hogy milyen megfontolás alapján kerültek ezek a ligandok kiválasztásra.

Egyetértek opponens asszony véleményével, a fejezet rövid, ennek oka, hogy csak a közvetlen, pontokba szedett célkitűzéseimet kívántam ismertetni.

Az anyagok kiválasztásának szempontjai, az ezeket megelőző funkcionális és receptorkötési vizsgálatok ismertetését a Discussion fejezet elejére tettem. Lehetséges, hogy szerencsésebb lett volna a célkitűzések között bemutatni ezeket, de szerettem volna elkerülni az ismétléseket.

2. A Materials and Methods fejezetben (p.38) szerepel egy táblázat, ami hiányos és zavaros. Tévesen szerepel a ligandok szerkezetében az Achc és nincs megmagyarázva, hogy ez minek lenne a rövidítése.

A szintetizált EM-2 derivátumokat Tóth Géza professzor úr és munkatársai biztosították számunkra. A szintézist és az in vitro méréseket ők végezték el, erre utalok a táblázat magyarázatában a 39. oldalon, az erre vonatkozó in vitro eredményeket 2011-ben közzétették le (Keresztes és mtsai, 2011). A 2-amino ciklohexán karbonsav (Achc) rövidítését ebben a közleményben is így alkalmazták, ennek megfelelően használtuk mi is. Bár a rövidítések jegyzékében feltüntettem az Achc magyarázatát, valóban azt a táblázat keretében is meg kellett volna tennem.

A rendelkezésre álló táblázat oldalba illesztése eredményezte a  $K_i$  érték számainak két sorba történő bontását, ami valóban nagyon zavaró.

3. Az endomorfín származékokkal született eredményeket bemutató ábrák félresikerültek, opponensnek a csatolt cikk nyújtott segítséget a megértéshez, ezért javaslom, a jelenlegi A-D ábrák javítását. A-D ábrák nagyon kicsik, a hasonló szimbólumok és színek pl. kontrol és EM esetén az olvasót nehéz feladat elé állítják. A szignifikancia jeleknek az egyes mérési pontok fölött kell szerepelnie. Fig D össze lett préselve és a szimbólumok csak részben látszanak 10µg dózisnál. F-K-nál az ábraszövegből hiányzik, hogy a szignifikancia jelek mit reprezentálnak.

Egyetértek opponens asszony bírálatával, melyben az ábrák méretét kifogásolja. Számomra is problémát jelentett az ábrák méretezése, ez volt az a maximális méret mellyel még úgy éreztem nem csorbitom az érthetőséget. Nagyobb méret mellett a dolgozat tagoltsága már zavaró lett volna illetve jelentősen

túlléptem volna a rendelkezésre álló oldalkikötést. Megoldást jelenthetett volna, ha mellékletben a szöveg terjedelmét nem befolyásoló módon tudtam volna bemutatni az ábrákat. A helyhiány magyarázza, hogy a szignifikancia jelek az adott időintervallumok fölé kerültek, de mivel színekódoltak reméltem, hogy könnyen értelmezhetőek.

A Figure D ábra valóban könnyebben értelmezhetőbb lett volna az AUC értékek (függőleges tengely) széthúzásával.

A Figure F-K ábrák magyarázatánál hiányzik a szignifikancia jelek értelmezése, ezt szintén helyhiány miatt hagytam el gondolva arra, hogy az egységes jelhasználat az előző ábrák alapján értelmezi a jelet.

Előadásomban igyekszem áttekinthető ábrákat bemutatni, amelyek az eredményeket érthetővé teszik.

4. A dolgozat vegyesen nevezi az ópioid receptor típusokat „mu-, delta-, kappa opioid”-nak illetve a görög betűs „μ, δ, κ opioid”-nak és a MOR rövidítést sem konzekvensen használja, ezt egyesíteni kellene.

Egyetértek professzornő erre vonatkozó bírálatával, és előadásomban igyekszem egységes rövidítést alkalmazni.

5. Az endomorfín-1 és endomorfín 2-et Zadina és mtsai 1997-ben fedezték fel és a Nature-ben közzölték. Az értekezés szövegében (p.19), a tézisekben, sőt az irodalomjegyzékben is helytelenül 1977 szerepel.

Egyetértek professzornő erre vonatkozó bírálatával, valóban elírás történt.

6. A 21. oldal legutolsó sorában szerepel „EM produced dose-dependent, naloxone-reversible analgesia” etc. A megadott referencia Li et al. 1976 referencia téves, a cikk β-endorfinról szól.

Egyetértek professzornő erre vonatkozó bírálatával, valóban elírás történt. A helyes közlemény:

Li ZH, Shan LD, Jiang XH, Guo SY, Yu GD, Hisamitsu T, Yin QZ. Analgesic effect of endomorphin-1. Acta Pharmacol Sin. 2001;22:976-80

7. A Methods-ből nem derül ki, hogy a Series 1-ben az oszteoarthritisz indukálására használt MIA minek a rövidítése és az sem, hogy ez irodalomból átvett módszer-e (p.39).

A MIA-t a 36. oldalon a Drugs részben említettem meg először, és itt jeleztem a rövidítést „monosodium iodoacetate (MIA)” is. A későbbiekben már csak a MIA rövidítést használtam.

A MIA hatásmechanizmusára, mely szerint a kondrociták metabolizmusát befolyásolva okoz oszteoarthritiszt a Discussioban (p.51) tértem ki, talán valóban jobb lett volna, már itt utalni a hatásmechanizmusra. A MIA használatát oszteoarthritisz következtében kiváltott fájdalom vizsgálatára Bove és mtsai vezették be 2010 (p.51).

Professzornő kérdéseire válaszaim a következők:

1. Mi indokolta, hogy az endorfinok és a kannabinoidok vizsgálata más fájdalom modellben (akut, illetve krónikus gyulladás) történt?

Az irodalomban fellelhető adatok, vizsgálatok elemzése alapján választottuk ki modellünket.

Számos endomorfín derivátum fájdalomcsillapító hatását vizsgálták és igazolták szisztémás, intracerebroventrikuláris alkalmazás során akut fájdalom tesztekben in vivo és in vitro körülmények között, ellenben csak néhány tanulmány vizsgálta spinális alkalmazás során ezen készítmények hatásosságát (Labuz és mtsai, 2003; Krusszynski és mtsai, 2005; Perlokowska és mtsai, 2009, 2010; Gao és mtsai, 2006; Yu és mtsai, 2007; Wang és mtsai, 2011; Mallareddy és mtsai, 2011). Ugyanakkor nem rendelkezünk adatokkal ezen vegyületek hatásairól krónikus fájdalom modellben.

Eredményeink igazolták, hogy a morfin, endomorfín-2 és az alkalmazott derivátumok, intratekális alkalmazása csökkenti a MIA által létrehozott mechanikai allodíniát, alátámasztva a gerincvelőben az ópíoid receptorok szerepét ezen típusú fájdalomban.

A második kísérleti sorozatban, az endogén kannabinoidok vizsgálatok a spinális alkalmazásra fókuszáltunk, az irodalmi adatok döntően akut fájdalom modellből származnak.

Ezen ligandok hatásairól spinális szinten relatíve kevés adat állt rendelkezésre. Korábbi tanulmányok igazolták, hogy az intratekálisan alkalmazott anandamid csökkenti az érzékenységet akut hő-fájdalom tesztben (hot plate, tail flick teszt), a fenti hatások kialakulásában mind a CB1, mind a TRPV1 receptor szerepet játszik (Yaksh és mtsai, 2006; Horvath és mtsai, 2008; Tuboly és mtsai, 2009).

A 2-AG fájdalomcsillapító hatását csak néhány publikáció támasztja alá. Szisztémás alkalmazás mellett akut fájdalom tesztben (Mechoulam és mtsai, 1995; Ben Shabat és mtsai, 1998), lokális alkalmazás során formalin és karragén tesztben találták hatásosnak (Guindon és mtsai, 2007; Mecs és mtsai, 2010). Ami a spinális alkalmazást illeti, mi voltunk az elsők, akik igazolták a szer fájdalomcsillapító hatását és azt, hogy ez a hatás gátolható CB1 antagonistákkal (CB2 antagonistával nem), ebből az következik, hogy a 2-AG fájdalomcsillapító hatása spinális szinten főleg a CB1 receptor aktivitásának a következménye.

Bár a két közlemény ugyanazon évben jelent meg, laboratóriumunkban az inkább akut gyulladásos fájdalomhoz köthető karragén alkalmazása helyett áttértünk a human arthropátiát jobban szimuláló oszteoartrózis modelljére. Így az endomorfín derivátumokat már ebben a tesztben vizsgáltuk meg, és igazoltuk, hogy a porcdestrukció miatt kialakuló krónikus fájdalom modelljében is hatékonyak ezek a ligandok.

2. Ismert-e, hogy az ízületi gyulladás hogyan befolyásolja az ópíoid, illetve CB receptorok számát, affinitását? Megváltozik-e az agonisták analgetikus potenciálja a normál szövetben mért értékhez képest?

Az oszteoartritist, mint degeneratív betegséget az ízületi porc károsodása jellemzi. Kóroktana nem teljesen tisztázott ebben mechanikai, metabolikus és gyulladásos folyamatok is részt vesznek.

Klinikai megjelenési formája komplex, a fájdalmas állapotot mind nociceptív, mind neuropathiás mechanizmusok meghatározzák.

Klinikai és kísérleti eredmények azt igazolták, hogy az ópíoidok perifériás fájdalomcsillapító hatékonysága fokozódik gyulladás vagy szöveti sérülés esetén, de az érintett folyamatok még nem teljes körűen feltártak (Stein, 1993; Zöllner és mtsai, 2003; Obara és mtsai, 2009; Zambelli és mtsai, 2014). A jelenség mögött kimutatható volt az emelkedett ópíoid receptor mRNA szint, fokozott ópíoid receptor expresszió (Maekawa és mtsai, 1996; Puehler és mtsai, 2004). Továbbá növekedett az ópíoid agonisták kötődése (Zöllner és mtsai, 2003; Shaqura és mtsai, 2004), és gyulladás során fokozódott az endogén ópíoidok felszabadulása is (Stein, 1993). Az ópíoid receptor aktivitás szabályozásában számos intracelluláris jelátviteli kaszkád szerepe felmerült, így a PI3K $\gamma$ /AKT (Cunha és mtsai, 2010), csakúgy mint a mitogén aktivált protein kináz (MAPKs) és protein kináz C (PKC) (Connor és Christie, 1999).

Több szerző vizsgálta az idegnövekedési faktor (NGF) szerepét (Pezet és mtsai, 2001; Mousa és mtsai, 2007).

Számos bizonyíték azt támasztja alá, hogy az endokannabinoid rendszer aktívan részt vesz az oszteoarthritishez kapcsolódó ízületi fájdalom patofiziológiájában. CB1 és CB2 receptorokat mutattak ki rágcsálók ízületi szöveteiben (Schuelert és McDougall 2008; Schuelert és mtsai, 2010), továbbá emberben (Richardson és mtsai, 2008). Nemcsak a CB1 és CB2 receptor mRNA szint emelkedését mutatták ki, de az anandamid és 2-AG szintjének emelkedését is synovialis biopsziával oszteoartrotikus ízeletekből (Richardson és mtsai, 2008). Gerincvelői szinten az anandamid, a 2-AG valamint a szintetizáló enzimek szintjének az emelkedését is kimutatták patkányokban MIA által indukált oszteoarthritis esetén (Sagar és mtsai, 2010). A CB1 és CB2 receptor expressziójának gátlását találták az azonos oldali gerincvelői szinten egerekben MIA injekcióját követően, melynek magyarázata valószínűleg a spinális szinten mért emelkedett endokannabinoid szint (La Porta és mtsai, 2013). Génmódosított egereken végzett kísérletekben kimutatták, hogy, CB-2 receptor knockout egerekben a MIA adása után kialakult mechanikai allodínia fokozódott, míg hasonló hatás CB1 receptor knockout egerekben nem volt megfigyelhető (Racz és mtsai, 2008, La Porta és mtsai 2013).

CB1 receptor agonista, arachidonyl-2-chloroethylamide (ACEA) lokális adása a térdízületben, csökkentette az afferens nociceptorok hiperszenzitivitását patkányokban MIA modellben, a folyamatban mind a CB1 receptor, mind a TRPV1 receptor érintett (Schuelert és McDougall 2008). A-796260 (CB2 receptor agonista) szisztémás adása dózis függő analgetikus hatást eredményezett patkány MIA modellben (Yao és mtsai 2008). Hasonló eredményről számoltak be, amikor JWH133, (CB2 receptor agonista) hatást vizsgálták hasonló modellben (Burnston és mtsai, 2013).

Az endokannabinoid szint növelésének másik lehetséges módja a lebontásuk gátlása. A zsírsavamid-hidroláz gátló URB597 szisztémás és lokális adása mellett tapasztaltak fájdalomcsillapító hatást oszteoarthritis modellben (Schuelert és mtsai, 2011).

Az oszteoarthritis során a kannabinoidok szerepe nemcsak a fájdalomcsillapításban, de a gyulladáscsökkentésben továbbá a porc és csontsejtekre kifejtett hatásában is felmerült.

A kannabinoidok direkt hatást gyakorolnak a porcsejtekre a szinóvium és a csont anyagcserére, úgymint szabályozzák a csont tömegét, a csontvesztést, a csontsejtek funkcióját, de a mechanizmus nem minden részletében tisztázott (Idris és Ralston 2012). Szintetikus kannabinoidok védő hatást fejtenek ki a porc extracelluláris mátrixát érintő degradáció során, gátolják a gyulladásos mediátorok szintézisét többek között reumatoid arthritisben (Mbvandula és mtsai, 2005, 2006, Selvi és mtsai, 2008). Feltételezik, hogy a CB1 és CB2 receptor expresszió fokozódása protektív hatást fejt ki a porc remodelációra porcbeültetés során (Lee és mtsai, 2012).

### 3. Próbálták-e az új endomorfín származékok in vivo hatását naloxonnal antagonizálni?

Ilyen jellegű vizsgálatot nem végeztünk, elfogadtuk az in vitro eredményeket, de további preklinikai vizsgálatokban ezeket a kísérleteket is el kell végezni.

4. A dolgozatban az új endomorfín származékok ED<sub>25</sub> értékeit hasonlították össze, amelyek nem különböztek szignifikánsan az alapvegyülettől. Hasonló eredményt kaptak volna, ha az ED<sub>50</sub> értéket hasonlítják össze, melyek jobban korrelálhatók a GTP<sub>γ</sub>S mérés EC<sub>50</sub> és receptorkötés K<sub>i</sub> értékével?

Mivel egyes ligandok nem érték el (elsősorban rövid hatástartamuk miatt) az ED<sub>50</sub> értéket, ezért az összehasonlíthatóság kedvéért számoltunk az ED<sub>25</sub> értékekkel.

Válaszomban idézett közlemények jegyzéke:

Ben Shabat S, Fride E, Sheskin T, Tamiri T, Rhee MH, Vogel Z, et al. An entourage effect: Inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonoyl-glycerol cannabinoid activity. *Eur J Pharmacol.* 1998;353: 23-31.

Burston JJ, Sagar DR, Shao P, Bai M, King E, Brailsford L, et al. Cannabinoid CB2 receptors regulate central sensitization and pain responses associated with osteoarthritis of the knee joint. *PLoS One.* 2013 25;8:80440.

Connor M, Christie MD. Opioid receptor signalling mechanisms. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1999;26:493-9.

Cunha FQ, Ferreira SH, MoCunha TM, Roman-Campos D, Lotufo CM, Duarte HL, et al. Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3Kgamma/AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:4442-7

Gao Y, Liu X, Liu W, Qi Y, Liu X, Zhou Y, et al. Opioid receptor binding and antinociceptive activity of the analogues of endomorphin-2 and morphiceptin with phenylalanine mimics in the position 3 or 4. *Bioorg Med Chem Letters.* 2006;16: 3688-92.

Guindon J, Desroches J, Beaulieu P. The antinociceptive effects of intraplantar injections of 2-arachidonoyl glycerol are mediated by cannabinoid CB2 receptors. *Br J Pharmacol.* 2007;150: 693-701.

Horvath G, Kekesi G, Nagy E, Benedek G. The role of TRPV1 receptors in the antinociceptive effect of anandamide at spinal level. *Pain* 2008;134: 277-84.

Idris AI, Ralston SH. Role of cannabinoids in the regulation of bone remodeling. *Front Endocrinol* 2012; 3:1–8.

Kruszynski R, Fichna J, Do-Rego JC, Chung NN, Schiller PW, Kosson P, et al. Novel endomorphin-2 analogs with mu-opioid receptor antagonist activity. *J Pept Res.* 2005;66: 125-31.

Labuz D, Chocyk A, Wedzony K, Toth G, Przewlocka B. Endomorphin-2, deltorphin II and their analogs suppress formaline-induced nociception and c-Fos expression in the rat spinal cord. *Life Sci.* 2003;73: 403-12.

La Porta C, Bura SA, Aracil-Fernández A, Manzanares J, Maldonado R. Role of CB1 and CB2 cannabinoid receptors in the development of joint pain induced by monosodium iodoacetate. *Pain*. 2013 ;154:160-74.

Law PY, Wong YH, Loh HH. Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2000;40:389-430.

Lee HR, Park KM, Joung YK, Park KD, Do SH. Platelet-rich plasma loaded hydrogel scaffold enhances chondrogenic differentiation and maturation with up-regulation of CB1 and CB2. *J Control Release* 2012;159:332-7.

Maekawa K, Minami M, Masuda T, Satoh M. Expression of mu- and kappa-, but not delta-, opioid receptor mRNAs is enhanced in the spinal dorsal horn of the arthritic rats. *Pain* 1996;64:365–371.

Mallareddy JR, Borics A, Keresztes A, Kover KE, Tourwe D, Toth G. Design, synthesis, pharmacological evaluation, and structure-activity study of novel endomorphin analogues with multiple structural modifications. *J Med Chem*. 2011;54:1462-72.

Mbvundula EC, Bunning RAD, Rainsford KD. Effects of cannabinoids on nitric oxide production by chondrocytes and proteoglycan degradation in cartilage. *Biochem Pharmacol*. 2005;69:635–640.

Mbvundula EC, Bunning RAD, Rainsford KD. Arthritis and cannabinoids: HU-210 and Win-55,212-2 prevent IL-1 $\alpha$ -induced matrix degradation in bovine articular chondrocytes in-vitro. *J Pharm Pharmacol*. 2006;58:351–58.

Mechoulam R, Ben Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*. 1995;50: 83-90.

Mecs L, Tuboly G, Toth K, Nagy E, Nyari T, Benedek G, et al. Peripheral antinociceptive effect of 2-arachidonoyl-glycerol and its interaction with endomorphin-1 in arthritic rat ankle joints. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010;37: 544-50.

Mousa SA, Cheppudira BP, Shaqura M, Fischer O, Hofmann J, Hellweg R, et al. Nerve growth factor governs the enhanced ability of opioids to suppress inflammatory pain. *Brain*. 2007;130:502-13.

Obara I, Parkitna JR, Korostynski M, Makuch W, Kaminska D, Przewlocka B, et al. Local peripheral opioid effects and expression of opioid genes in the spinal cord and dorsal root ganglia in neuropathic and inflammatory pain. *Pain* 2009;141:283–291.

Pezet S, Onténiente B, Jullien J, Junier MP, Grannec G, Rudkin BB, et al. Differential regulation of NGF receptors in primary sensory neurons by adjuvant-induced arthritis in the rat. *Pain*. 2001; 1:113-25.

Perlikowska R, Gach K, Fichna J, Toth G, Walkowiak B, do-Rego JC et al. Biological activity of endomorphin and [Dmt1]endomorphin analogs with six-membered proline surrogates in position 2. *Bioorg Med Chem*. 2009;17: 3789-94.

Perlikowska R, do-Rego JC, Cravezic A, Fichna J, Wyrebska A, Toth G, et al. Synthesis and biological evaluation of cyclic endomorphin-2 analogs. *Peptides* 2010;31: 339-45.

Puehler W, Zöllner C, Brack A, Shaqura MA, Krause H, Schäfer M, et al. Rapid upregulation of mu opioid receptor mRNA in dorsal root ganglia in response to peripheral inflammation depends on neuronal conduction. *Neuroscience*. 2004;129:473-9.

Racz I, Nadal X, Alferink J, Baños JE, Rehnelt J, Martín M, et al. Crucial role of CB(2) cannabinoid receptor in the regulation of central immune responses during neuropathic pain. *J Neurosci*. 2008;28:12125–35.

Richardson D, Pearson RG, Kurian N, Latif ML, Garle MJ, Barrett DA, et al. Characterisation of the cannabinoid receptor system in synovial tissue and fluid in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2008;10:R43.

Sagar DR, Staniaszek LE, Okine BN, Woodhams S, Norris LM, Pearson RG, et al. Tonic modulation of spinal hyperexcitability by the endocannabinoid receptor system in a rat model of osteoarthritis pain. *Arthritis Rheum* 2010;62:3666–76.

Selvi E, Lorenzini S, Garcia-Gonzalez E, Maggio R, Lazzerini PE, Capecchi PL, et al. Inhibitory effect of synthetic cannabinoids on cytokine production in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Clin Exp Rheumatol*. 2008;26:574–81.

Schuelert N, McDougall JJ. Cannabinoid-mediated antinociception is enhanced in rat osteoarthritic knees. *Arthritis Rheum*. 2008;58:145–53.

Schuelert N, Zhang C, Mogg AJ, Broad LM, Hepburn DL, Nisenbaum ES, et al. Paradoxical effects of the cannabinoid CB2 receptor agonist GW405833 on rat osteoarthritic knee joint pain. *Osteoarthritis Cartilage* 2010;18:1536–43.

Schuelert N, Johnson MP, Oskins JL, Jassal K, Chambers MG, McDougall JJ. Local application of the endocannabinoid hydrolysis inhibitor URB597 reduces nociception in spontaneous and chemically induced models of osteoarthritis. *Pain* 2011;152:975–81.

Stein C. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. *Anesth Analg*. 1993;76:182–91.

Tuboly G, Mecs L, Benedek G, Horvath G. Antinociceptive interactions between anandamide and endomorphin-1 at the spinal level. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009;36: 400-5.

Wang Cl, Guo C, Wang Yq, Zhou Y, Li Q, Ni Jm, et al. Synthesis and antinociceptive effects of endomorphin-1 analogs with C-terminal linked by oligoarginine. *Peptides* 2011;32: 293-9.

Yaksh TL, Kokotos G, Svensson CI, Stephens D, Kokotos CG, Fitzsimmons B, et al. Systemic and intrathecal effects of a novel series of phospholipase A2 inhibitors on hyperalgesia and spinal prostaglandin E2 release. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;316: 466-75.

Yao BB, Hsieh GC, Frost JM, Fan Y, Garrison TR, Daza V, et al. In vitro and in vivo characterization of A-796260: a selective cannabinoid CB2 receptor agonist exhibiting analgesic activity in rodent pain models. *Br J Pharmacol*. 2008;153:390–401.

Yu Y, Shao X, Wang Cl, Liu HM, Cui Y, Fan YZ, et al. In vitro and in vivo characterization of opioid activities of endomorphins analogs with novel constrained C-terminus: Evidence for the important role of proper spatial disposition of the third aromatic ring. *Peptides* 2007;28: 859-70.

Zambelli VO, Fernandes AC, Gutierrez VP, Ferreira JC, Parada CA, Mochly-Rosen D, et al. Peripheral sensitization increases opioid receptor expression and activation by crotalphine in rats. *PLoS One*. 2014 4;9:90576.

Zollner C, Shaqura MA, Bopaiah CP, Mousa S, Stein C, Schafer M. Painful inflammation-induced increase in mu-opioid receptor binding and G-protein coupling in primary afferent neurons. *Mol Pharmacol*. 2003;64:202-10.



Ismételnem szeretném megköszönni munkám alapos, részletes és mélyreható elemzését. Kritikai észrevételei jelentős segítséget jelentenek számomra jövőbeni munkám pontosabb, hatékonyabb megvalósításában.

Bízom abban, hogy a felvetett megjegyzésekre és kérdésekre adott válaszaim elfogadja, ezáltal is támogatva munkámat.

Kecskemét, 2017. október 14.

Tisztelettel:

Dr. Kovács Gyula